製品コード　TS002

研究用試薬

RYTS Linear Template Set for *E.coli* (ProX-tag)

48 reactons

取扱説明書

(Version 1.1)

■本製品には PCR 試薬は含まれておりませんので、別途ご用意ください。 (ロシュ・ダイアグノスティックス社 Expand High Fidelity PCR System を推奨)
■包装袋のラベルに記載されている有効期限内に必ずご使用ください。
■本製品は研究用試薬ですので、臨床診断用途には使用しないでください。
■万一、試薬などが目や皮膚に付着した場合、また飲み込んだりした場合には、すみやかに医師に相談し、その指示に従ってください。
■廃棄される場合は、各施設の化学物質廃棄要領に従ってください。

株式会社プロテイン・エクスプレス
URL : http://www.proteinexpress.co.jp
〒260-0856　千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL : 043-202-5755
FAX : 043-202-5756
E-mail : tech@proteinexpress.co.jp

目次

1. はじめに

RYTS Linear Template Set はタンパク質の発現テンプレートを作製するための試薬です。2 ステップ PCR 法により転写/ 翻訳反応に必要な T7 プロモーター, RBS を含むタンパク質発現テンプレートを迅速、簡便に作製することができます(図 1)。作製した発現テンプレートには pROX vector シリーズにクローニング可能な制限酵素部位が含まれているため、スケールアップ発現にも対応しています。

本試薬を用いることで、N 末端に ProX-tag が付加された発現テンプレートを作製することができます(図 2)。作製された発現テンプレートは、Clover*Direct*™試薬を用いることで、非天然アミノ酸を N 末端領域(ProX-tag 中)に効率的に取り込ませることができます(TTT は、発現コントロールとしてご利用ください)。

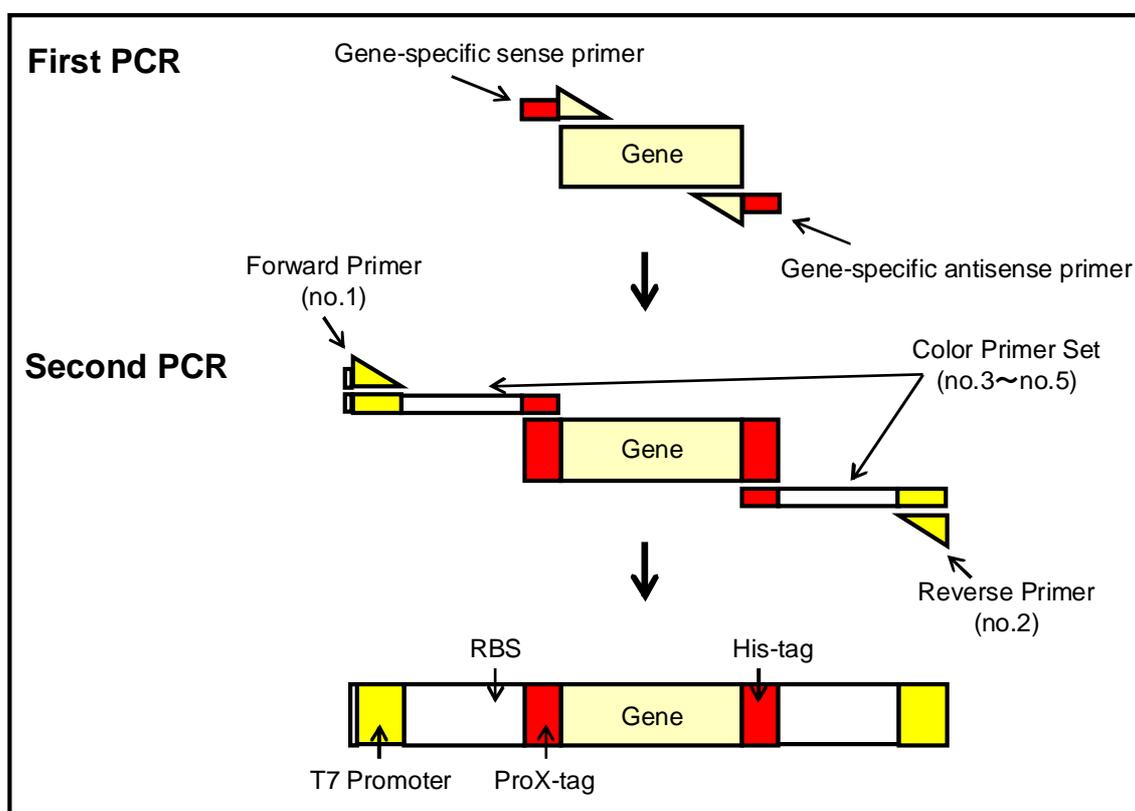



図 1：2 ステップ PCR による発現テンプレート作製原理

図 2： 本試薬で作製可能な発現テンプレート

CloverDirect™ 試薬は、無細胞翻訳系を利用してタンパク質の指定した部位に非天然アミノ酸を導入するための試薬です。導入部位の指定は終止コドンの1つであるUAG コドン(アンバーコドン)または CGGG コドン（4 塩基コドン）で行います。CloverDirect™試薬である非天然アミノ酸-tRNA は UAG コドンまたは CGGG コドンを読み取り、指定された位置に非天然アミノ酸を導入します。この際、終結因子（UAG コドンの場合）または Arg-tRNA（CGGG コドンの場合）が読み取ると、タンパク質合成は途中で停止します。したがって、完全長タンパク質として合成されたものは、100%の効率で非天然アミノ酸が導入されていることになります。

(詳細は CloverDirect™試薬の取扱説明書をご覧ください)

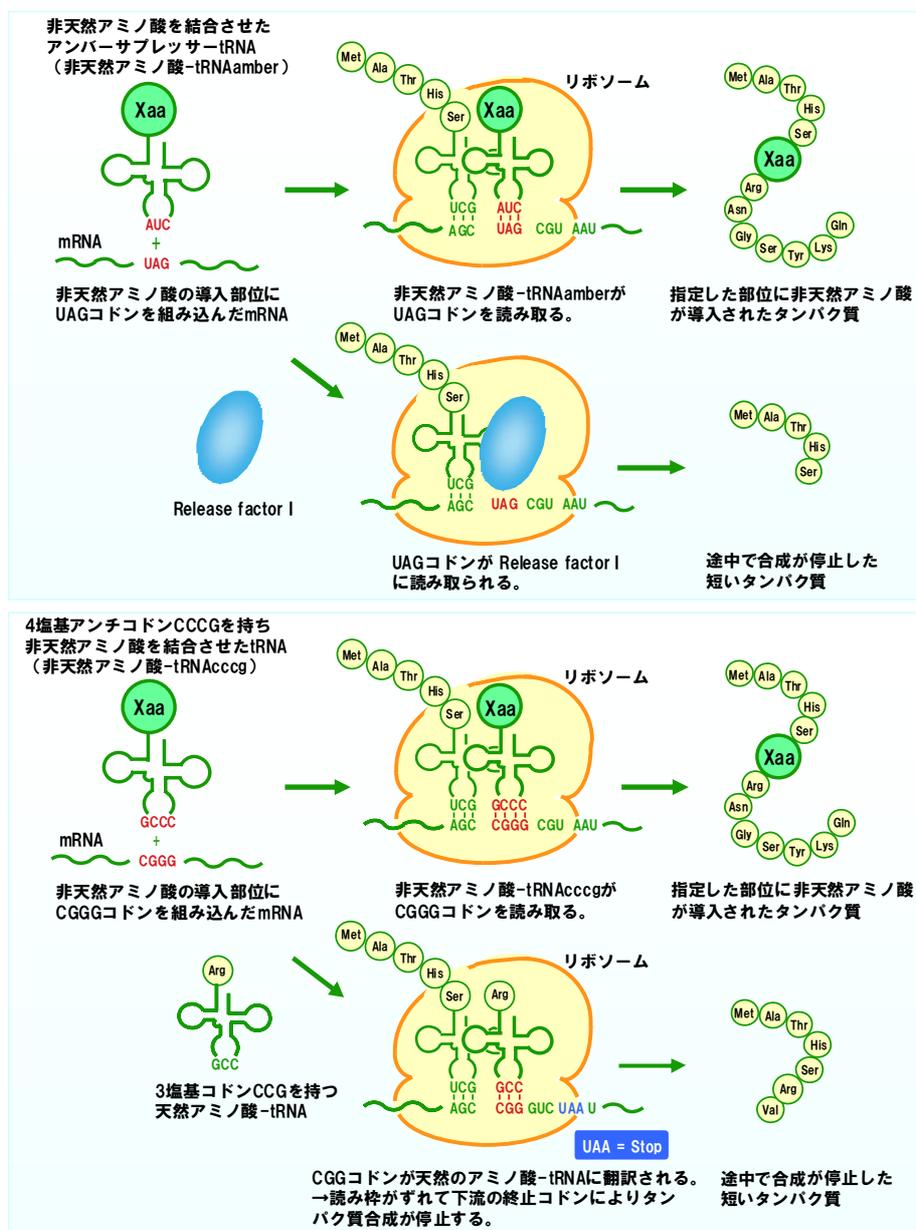



図 3：非天然アミノ酸の部特異的導入法の原理

2.　製品内容

■ 本製品に含まれるもの

No.(フタ色)	ラベル	容量	本数	備考
1. (透明)	Forward Primer	96 µL	1 本	T7 Promoter Primer
2. (透明)	Reverse Primer	96 µL	1 本	T7 Terminator Primer
3. (赤)	Red-Primer Set	48 µL	1 本	ProX-tag(amber) 用 DNA セット
4. (青)	Blue-Primer Set	48 µL	1 本	ProX-tag(cggg) 用 DNA セット
5. (黄)	Yellow-Primer Set	48 µL	1 本	ProX-tag(ttt)用 DNA セット
6. (紫)	Control Template (CAT) (100ng/µL)	20 µL	1 本	pROX FL92.1ttt-CAT vector

■ 保存条件

・－20℃以下

■ 品質保持期限

・包装袋のラベルに記載

■ 別途用意する試薬

・PCR 試薬

(例 : Expand High Fidelity PCR System; Roche Applied Science, # 1732641)

・DNA 精製キット

(例 : Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System; Promega, #A9282)

・目的遺伝子 DNA

(注意) 他社製試薬キットの使用は一例であり、ご使用目的に合わせて選択してください。

3. プロトコール

3-1. 発現テンプレート DNA の作製

■ 別途用意する試薬

- ・RNase フリー水
- ・テンプレート DNA (目的遺伝子)
- ・gene-specific sense primer
- ・gene-specific antisense primer
- ・PCR 試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス社 Expand High Fidelity PCR System を推奨)
- ・DNA 精製キット （プロメガ社 Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System を推奨）

(実験を始める前の重要事項)

■ 反応液に DNA やヌクレアーゼの混入を防ぐために手袋を着用し、DNase フリーの反応チューブやチップの使用を推奨します。

■ T7 プロモーターとターミネーターを含むテンプレート DNA の使用は避けてください。これら配列が含まれている場合は、制限酵素を用いて配列を取り除き、アガロースゲル電気泳動で分離、精製したものを使用してください。

(Step1) プライマー設計

Gene-specific sense primer とGene-specific antisense primer を表1を参考に設計します。

表 1：プライマー配列

ProX-tag (amber, cggg, ttt 共通)
・ Gene-specific sense primer : 5’- TCTAATGAGACC + **ATG** + 15～20nt sense primer
・ Gene-specific antisense primer : 5’- TGATGATGAGAACCCCCCCC + 15～20nt primer

(Step2) First PCR

設計したプライマー2 種と目的遺伝子を含むテンプレートDNA を用いてFirst PCR を行います。以下には PCR 試薬としてロシュ・ダイアグノスティック社 Expand High Fidelity PCR System を用いる場合の試薬の調製法について示します。他の PCR 試薬を用いる場合には、その製品の所定の反応組成に従って混合してください。

成分	容量(μL)	終濃度
PCR buffer, 10xconc. without $MgCl_2$	5	x1
10mM dNTP	1.25	250 μM
25mM $MgCl_2$	4	2 mM
Gene-specific sense primer (10 μM)	1	200 nM
Gene-specific antisense primer (10 μM)	1	200 nM
テンプレート DNA (100 ng/μL)	2	200 ng
Expand High Fidelity Enzyme mix	0.85	3 U
RNase フリー水	34.9	
Total	50	

※PCR サイクルの条件はご使用の試薬のプロトコールに従ってください。

(Step3) First PCR 産物の確認と精製

反応終了後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物がシングルバンドであることを確認します。その後 DNA 精製キットを用いて PCR 産物の精製を行います。目的の PCR 産物以外の副産物が確認される場合は、PCR 条件を変更するか、目的の PCR 産物をアガロースゲルから回収して使用してください。

(Step4) Second PCR

First PCR 産物とキット添付 Primer (表2)を用いて Second PCR を行います。以下には PCR 試薬としてロシュ・ダイアグノスティック社 Expand High Fidelity PCR System を用いる場合の試薬の調製法について示します。他の PCR 試薬を用いる場合には、その製品の所定の反応組成に従って混合してください。

成分	容量(μL)	終濃度
PCR buffer, 10xconc. without $MgCl_2$	5	x1
10mM dNTP	1.25	250 μM
25mM $MgCl_2$	4	2 mM
Forward Primer (no.1)	2	
Reverse Primer (no.2)	2	
Color-Primer Set (no.3, no.4 or no.5)	1	
First PCR product (100 ng/μL)	2	200 ng
Expand High Fidelity Enzyme mix	0.85	3 U
RNase フリー水	31.9	
Total	50	

※PCR サイクルの条件はご使用の試薬のプロトコールに従ってください。

表 2 : 使用する Primer 一覧

ProX-tag (amber)
・ Forward Primer (no.1; 透明) ・ Reverse Primer (no.2; 透明) ・ Red-Primer Set (no.3; 赤)
ProX-tag (cggg)
・ Forward Primer (no.1; 透明) ・ Reverse Primer (no.2; 透明) ・ Blue-Primer Set (no.4; 青)
ProX-tag (ttt)
・ Forward Primer (no.1; 透明) ・ Reverse Primer (no.2; 透明) ・ Yellow-Primer Set (no.5; 黄)

※ これら Primer Set により作製される塩基配列は、p.10 を参照ください。

(Step5) Second PCR 産物の確認と精製

反応終了後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物がシングルバンドであることを確認します。その後 DNA 精製キットを用いて PCR 産物の精製を行います。目的の PCR 産物以外の副産物が確認される場合は、PCR 条件を変更してください。また、目的の PCR 産物をアガロースゲルから回収して Forward Primer (no.1; 透明)および Reverse Primer (no.2; 透明)にて再度 PCR を行うことで、シングルバンドが得られる場合があります。PCR の回数が増えると PCR エラーの原因となりますので、4 回以上の PCR は避けてください。

大腸菌無細胞翻訳系へ作製した発現テンプレート DNA を添加することで、タンパク質を合成することができます(プロテイン・エクスプレス社 RYTS Kit (#CF001, #CF002)を推奨)。

(Step6) プラスミド DNA テンプレートの作製 (オプション)

本キットで作製した PCR テンプレートは、ProX vector シリーズに簡単にクローニングできるように設計されているため、大量スケールでのタンパク質発現にも利用することができます。Second PCR 産物の制限酵素部位(図 4)、および塩基配列(図 5)を確認ください。

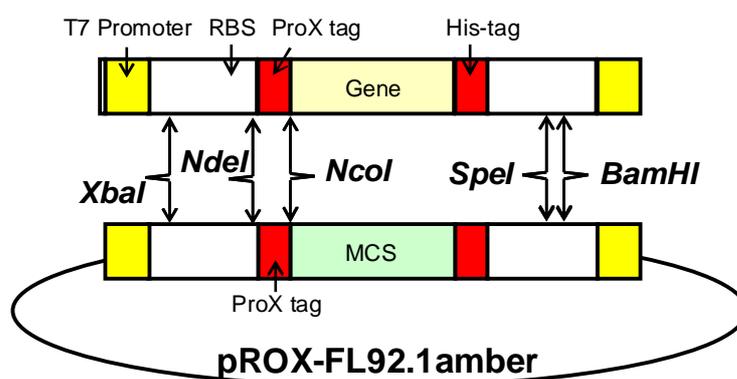



図 4： 制限酵素部位

pROX vector シリーズ
pROX-FL92.1amber (Cat. No.: TS011)
pROX-FL92.1cggg (Cat. No.: TS012)
pROX-FL92.1ttt (Cat. No.: TS013)

```
  T7-Promoter                                          Xba I
CTAATACGAC TCACTATAGG GAGACCACAA CGGTTTCCCT CTAGAAATAA

                                          NdeI
                  RBS                         ProXtag
TTTTGTTTAA CTTTAAGAA GGAGATATCAT ATGTCTAAAC AAATCGAAGT
                                  MetSerLysG lnIleGluVa

AAACTAGTCT AATGAGACCATG :: GENE :: GGGGGGGTTC TCATCAT
lAsnXaaSer AsnGluThrMet            GlyGlyGlySe rHisHis
```

```
(ProXtag (cggg)
...AACCGGGTCT AAT...
   AsnXaa Ser Asn

(ProXtag (ttt)
...AACTTTTCT AAT...
   AsnPheSer Asn
```

```
CATCATCATCATT AATAAAAGGG CGAATTCCAG CACACTGGCG GCCGTTA
HisHisHisHis* *****

                                             SpeI    BamHI
CAAGGGCGAATTC CAGCACACTG GCGGCCGTTA CTAGTGGATC CGGCTGCTAA

CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC TGCCACCGCT GAGCAATAACTAGC
```

図 5 : Second PCR 産物の塩基配列 (ProXtag (amber))

3-2. 発現テンプレートDNA作製例

本製品に含まれる付属のControl Template CAT (no.6)を用いて、First PCR、Second PCRを行った。First PCRには以下のPrimerを用いた。

・Gene-specific sense primer
　　5'- TCTAATGAGACCATGGAGAAAAAAATCACTGG -3'
・Gene-specific antisense primer
　　5'- TGATGATGAGAACCCCCCCCCGCCCCGCCCTGCCACTC -3'

First PCR、Second PCR反応産物を1.5% アガロースゲルで泳動した(図6)。各サンプルは、0.5、1、2 μLをアプライした。

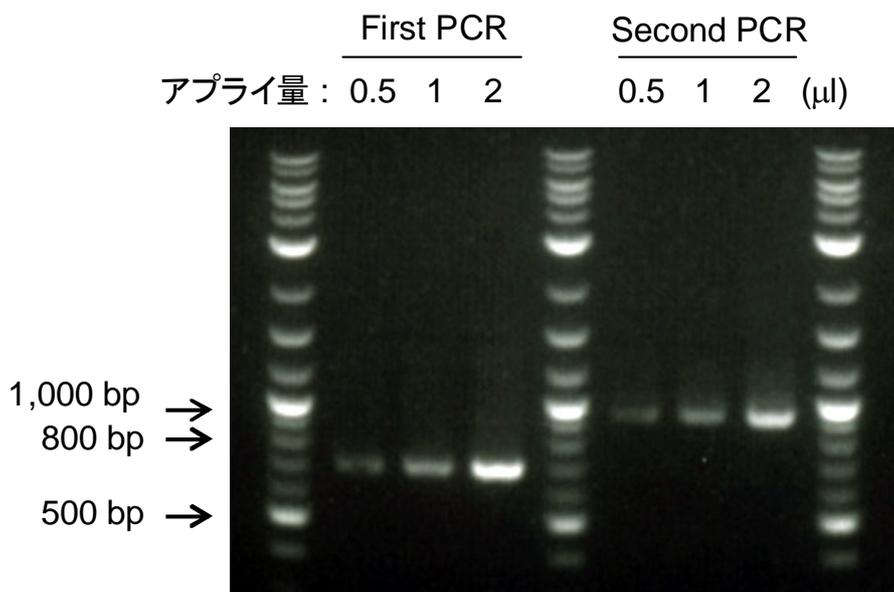



図6：First PCRおよびSecond PCR産物の電気泳動

3-3. 大腸菌無細胞翻訳系での発現例

本製品を用いて作製した C 末端に His-tag を含む CAT の PCR 産物および、pROX-FL92ttt vector (#TS013)へクローニングを行ったプラスミドを用いて大腸菌無細胞翻訳系(RYTS Kit(#CF002))で CAT を発現させた。反応液を 15% SDS-PAGE により分離し、抗 His-tag 抗体によりウエスタンブロットを行った(図 7)。

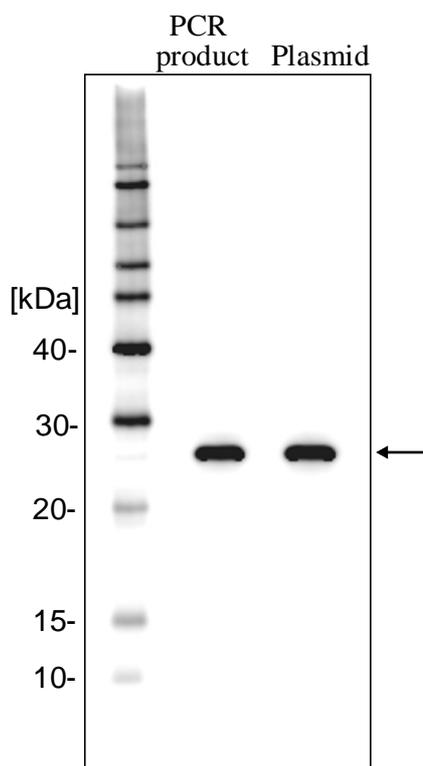



図 7 : CAT の発現確認

ゲルへのアプライ量 : 翻訳反応液 0.25 μL 相当量

4. トラブルシューティング

・First PCR および Second PCR

■ PCR 産物がほとんどない	
1) 試薬の使用期限が切れている。	使用期限内のものを使用してください。
2) 試薬の保存状態が適切でない。	－20℃以下で保存して下さい。
3) DNase, RNase の混入。	手袋等を着用し、ヌクレアーゼの混入には十分注意してください。
4) PCR 条件が最適でない。	ご使用の PCR 試薬に従って、PCR 条件を最適化してください。
5) プライマーデザインが最適でない。	p.6 プライマー設計を参照してください。

5. 製品紹介

・CloverDirect™ 試薬

ピンポイント蛍光標識 [for Fluorescence Labeling]

CloverDirect™ CR110-X-AF-tRNA [5-CR110-X : Abs/Em = 498/521nm]
CloverDirect™ HiLyte Fluor™ 488-AF-tRNA [HiLyte Fluor™ 488 : Abs/Em = 497/525nm]
CloverDirect™ TAMRA-X-AF-tRNA [5(6)-TAMRA-X : Abs/Em = 546/575nm]
CloverDirect™ ATTO 633-AF-tRNA [ATTO633 : Abs/Em = 629/657nm]
CloverDirect™ ATTO 655-X-AF-tRNA [ATTO655-X : Abs/Em = 633/684nm]

ピンポイントビオチン標識 [for Fluorescence Labeling]

CloverDirect™ Biotin-AF-tRNA [Biotin]
CloverDirect™ Biotin-X-AF-tRNA [Biotin-X]
CloverDirect™ Biotin-XX-AF-tRNA [Biotin-XX]

翻訳後修飾 [for Post-translational Modification]

CloverDirect™ Tyr(PO_3H_2)-tRNA [*O*-phospho-Tyr]
CloverDirect™ Lys(Me)-tRNA [ε-methyl-Lys]
CloverDirect™ Lys(Me_2)-tRNA [ε-dimethyl-Lys]
CloverDirect™ Lys(Ac)-tRNA [ε-acetyl-Lys]

非天然アミノ酸導入 [for Unnatural Mutagenesis]

PEG 標識アミノ酸

CloverDirect™ PEG4-AF-tRNA [Methyl-PEG4]
CloverDirect™ PEG8-AF-tRNA [Methyl-PEG8]
CloverDirect™ PEG12-AF-tRNA [Methyl-PEG12]

架橋アミノ酸

CloverDirect™ BPA-tRNA [*p*-benzoyl-phenylalanine]
CloverDirect™ AcPhe-tRNA [*p*-acetyl-phenylalanine]

光異性化アミノ酸

CloverDirect™ azoAla-tRNA [*p*-phenylazophenyl-alanine]

製品の詳細、その他非天然アミノ酸-tRNA につきましては。ホームページよりご覧ください。
(http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_1.htm)

・ 大腸菌無細胞翻訳系

製品名： Remarkable Yield Translation System Trial Kit (RYTS Trial Kit)
製品コード：CF001
合成スケール：0.3ml タンパク質合成反応スケール

製品名： Remarkable Yield Translation System Kit (RYTS Kit)
製品コード：CF002
合成スケール：0.3ml タンパク質合成反応スケール×5 反応 (計 1.5ml 反応スケール)

・ 2 ステップ PCR による発現テンプレート作製試薬

製品名： RYTS Linear Template Set for *E.coli* (His-tag)
製品コード：TS001
スケール：48 反応

製品名： RYTS Linear Template Set for *E.coli* (ProX-tag)
製品コード：TS002
スケール：48 反応

・大腸菌発現用ベクター

製品名： pROX-FL92.1amber
製品コード：TS011

製品名： pROX-FL92.1cggg
製品コード：TS012

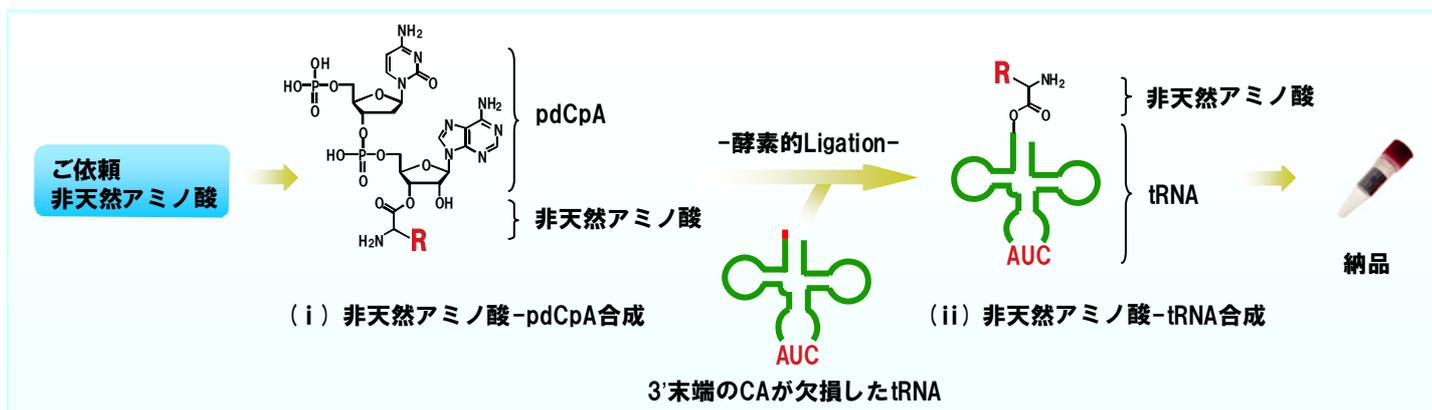
製品名： pROX-FL92.1ttt
製品コード：TS013

製品の詳細、その他非天然アミノ酸-tRNA につきましては。ホームページよりご覧ください。

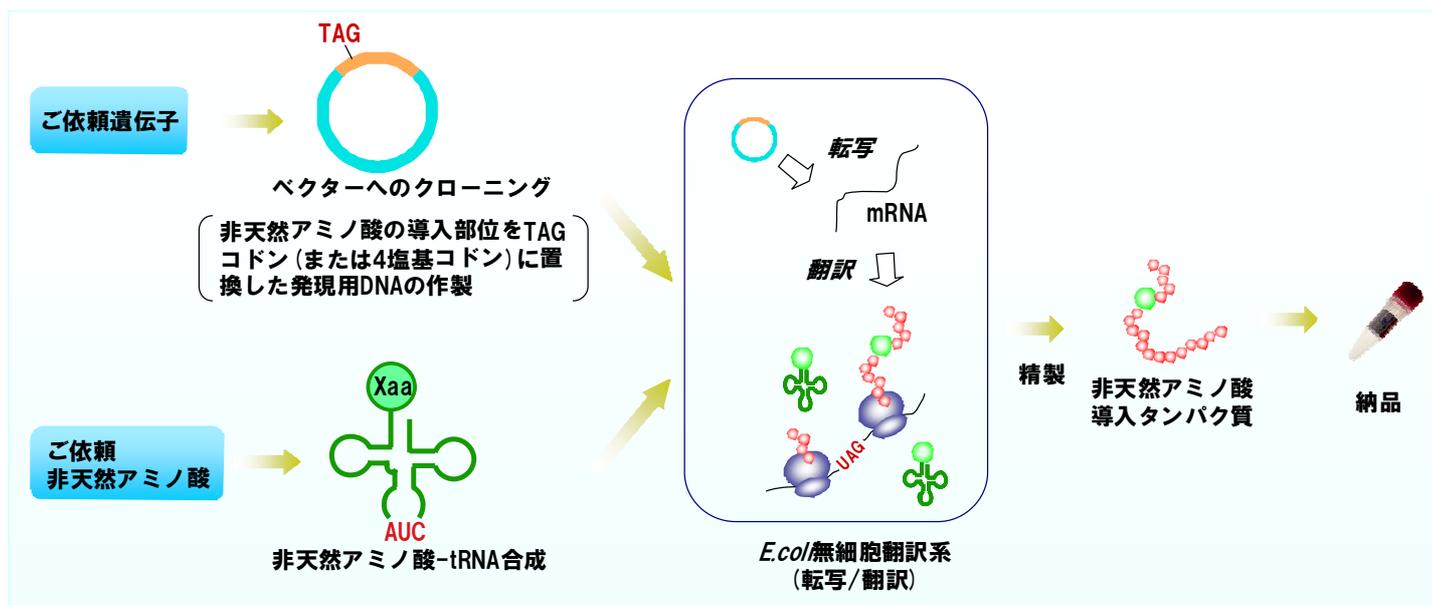
(http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_1.htm)

6. 受託サービスのご案内

非天然アミノ酸-tRNA 受託合成サービス

リスト以外に、非天然アミノ酸(標識アミノ酸、機能性アミノ酸など)を結合させた tRNA を作製いたします。オリジナルの非天然アミノ酸導入タンパク質の合成が可能になります。

非天然アミノ酸tRNA受託合成サービス

非天然アミノ酸導入タンパク質の受託合成サービス

アンバーコドンあるいは 4 塩基コドンを用いて、非天然アミノ酸(蛍光標識アミノ酸、機能性アミノ酸、その他標識アミノ酸など)を目的の部位へピンポイントに導入したタンパク質を、*E.coli* 由来の無細胞発現系を用いて合成いたします。また、設立以来、組み換えタンパク質生産の専門技術を持つ会社として蓄積されたタンパク質発現に関わる知識とノウハウを活かして、遺伝子の合成からタンパク質の精製までトータルサポート致します。

非天然アミノ酸導入タンパク質のトータル受託合成サービス

7. 製品についてのお問い合わせ先

株式会社プロテイン・エクスプレス
URL : http://www.proteinexpress.co.jp
〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL ： 043-202-5755
FAX ： 043-202-5756
E-mail ： tech@proteinexpress.co.jp